

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 1/16, 7/64, B01D 15/02</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/34918</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. September 1997 (25.09.97)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00525</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 14. März 1997 (14.03.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 11 094.7 21. März 1996 (21.03.96) DE</p> <p>(71) Anmelder: ARZNEIMITTELWERK DRESDEN GMBH [DE/DE]; Meissner Strasse 35, D-01445 Radebeul (DE).</p> <p>(72) Erfinder: VOIGT, Ullrich; Moritzburger Strasse 67, D-01127 Dresden (DE). HEMPEL, Roland; Ernst-Thälmann-Strasse 20, D-01462 Mobschatz (DE). KINKEL, Joachim; Waldhilbersheimer Strasse 4, D-55452 Guldental (DE). NICOUD, Roger-Marc; Novasep, 15, rue du Bois-de-la-Champelle, F-54502 Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex (FR).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: CN, CZ, HU, IL, JP, KR, NO, PL, RU, SK, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00525</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 14. März 1997 (14.03.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 11 094.7 21. März 1996 (21.03.96) DE</p> <p>(71) Anmelder: ARZNEIMITTELWERK DRESDEN GMBH [DE/DE]; Meissner Strasse 35, D-01445 Radebeul (DE).</p> <p>(72) Erfinder: VOIGT, Ullrich; Moritzburger Strasse 67, D-01127 Dresden (DE). HEMPEL, Roland; Ernst-Thälmann-Strasse 20, D-01462 Mobschatz (DE). KINKEL, Joachim; Waldhilbersheimer Strasse 4, D-55452 Guldental (DE). NICOUD, Roger-Marc; Novasep, 15, rue du Bois-de-la-Champelle, F-54502 Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex (FR).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CN, CZ, HU, IL, JP, KR, NO, PL, RU, SK, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00525</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 14. März 1997 (14.03.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 11 094.7 21. März 1996 (21.03.96) DE</p> <p>(71) Anmelder: ARZNEIMITTELWERK DRESDEN GMBH [DE/DE]; Meissner Strasse 35, D-01445 Radebeul (DE).</p> <p>(72) Erfinder: VOIGT, Ullrich; Moritzburger Strasse 67, D-01127 Dresden (DE). HEMPEL, Roland; Ernst-Thälmann-Strasse 20, D-01462 Mobschatz (DE). KINKEL, Joachim; Waldhilbersheimer Strasse 4, D-55452 Guldental (DE). NICOUD, Roger-Marc; Novasep, 15, rue du Bois-de-la-Champelle, F-54502 Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex (FR).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CN, CZ, HU, IL, JP, KR, NO, PL, RU, SK, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			
<p>(54) Title: CHROMATOGRAPHIC PROCESS FOR OBTAINING VERY PURE CYCLOSPORIN A AND RELATED CYCLOSPORINS</p> <p>(54) Bezeichnung: CHROMATOGRAPHISCHES VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON HOCHGEREINIGTEM CYCLOSPORIN A UND VERWANDTEN CYCLOSPORINEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The present invention relates to a novel chromatographic process which can be used on an industrial scale for purifying raw extracts containing cyclosporins. In the process, the conventional chromatographic methods of separation are replaced entirely or in part by the simulated moving bed method (SMB). The cyclosporin A obtained meets the quality requirements of USP XXIII and of European Pharmacopoeia, 2nd Edition, 1995.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues chromatographisches Verfahren, das im industriellen Maßstab zur Aufreinigung von Cyclosporine enthaltenden Rohextrakten geeignet ist. Dabei werden die konventionellen präparativen chromatographischen Trennmethode ganz oder zumindest teilweise durch die simulated moving bed Methode (SMB) ersetzt. Das erhaltene Cyclosporin A entspricht sowohl den Qualitätsanforderungen der USP XXIII als auch der European Pharmacopoeia, 2. Edition 1995.</p>				

Chromatographisches Verfahren zur Gewinnung von hochgereinigtem Cyclosporin A und verwandten Cyclosporinen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur chromatographischen Aufreinigung von Cyclosporin A (Cy A) und verwandten Cyclosporinen, das für die Anwendung in der pharmazeutischen Industrie geeignet ist.
- Dabei werden die Wirkstoffe zu ökonomisch günstigen Bedingungen in einer pharmazeutisch akzeptablen Reinheit erhalten, d.h. im Falle von Cyclosporin A werden
- 10 beispielsweise die Reinheitsanforderungen der PHARMEUROPA (PHARMEUROPA Vol.4, No. 4, Seite 270, December 1992) erfüllt.

- Mit der erfolgreichen Isolierung von Cyclosporin A aus *Trichoderma polysporum* (LINK ex PERS.) Rifai durch A. Rügger und Mitarbeiter [Helv. Chim. Acta 59, 112, (1976)]
- 15 wurde erstmalig eine neue, stark immunsuppressive Substanzklasse zugänglich. Durch intensive Untersuchungen wurden in der Zwischenzeit mehr als 25 verwandte Cyclosporine mit immunsuppressiver und antifungischer Aktivität bekannt [R. Traber et al. Helv. Chim. Acta 70, 13 (1987)].
- Heutzutage ist die herausragende Bedeutung des Cyclosporin A als Mittel der Wahl bei
- 20 der Unterdrückung der Immunabwehr nach Organtransplantationen unbestritten. Infolgedessen hat es in der Vergangenheit nicht an Anstrengungen gefehlt, um durch Verbesserung des Herstellungsverfahrens die ständig steigenden Anforderungen bezüglich Menge und Qualität für diesen lebensrettenden Arzneistoff zu erfüllen.

- 25 Die bisher bekannten technischen Lösungen zur Aufreinigung von Cyclosporin A-haltigen Rohextrakten beinhalten meist mehrere Chromatographiestufen unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln als Elutionsmittel.
- So wird in der oben erwähnten Arbeit von A. Rügger zunächst an Kieselgel 60 Merck (0,063-0,2 mm) mit Chloroform bei steigenden Mengen Methanol chromatographiert.
- 30 Anschließend wird das gewonnene Produkt an Sephadex LH 20 in Methanol einer Gelchromatographie unterworfen und danach schließlich an Aluminiumoxid (Brockmann, Akt. I) in Toluol mit steigenden Anteilen Ethylacetat chromatographiert.

- Einer ähnlichen Verfahrensweise bedienen sich auch spätere Arbeiten (Tabelle 1).
- 35 Häufig finden die Adsorbentien Sephadex LH 20, Kieselgel 60 Merck (0,063-0,2 mm)

und Aluminiumoxid neutral Verwendung.

Als Fließmittel werden meist Gemische organischer Lösungsmittel eingesetzt.

5 Aufgrund ihrer hohen Toxizität sind dabei Chloroform und Methylenchlorid, sowohl bezüglich verbleibender Lösungsmittelreste im Wirkstoff als auch wegen der daraus resultierenden sicherheitstechnischen Probleme bei der Verarbeitung größerer Mengen dieser Stoffe (Destillation, Entsorgung), ungeeignet.

10 Ferner ist bei der Anwendung von Gradienten oder komplizierter, beispielsweise ternärer, isokratischer Mischungen eine neue Einstellung der Fließmittel nach der Destillation der Eluate umständlich und teuer.

Ähnlich ist auch eine von BIOGAL in dem kanadischen Patent CA 2 096 892

15 beschriebene Methode zu bewerten, bei welcher der Rohextrakt vor der Chromatographie einer Temperaturbehandlung unterworfen wird.

Das Rohprodukt wird hier ca. 1 Stunde auf ca. 110°C erhitzt und anschließend definiert über 5 Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt. Unter Einsatz eines hohen Anteils chlorierter Kohlenwasserstoffe werden in zwei nacheinander eingesetzten

20 Fließmittelsystemen in einer einstufigen Chromatographie an Kieselgel 60 ca. 15% der aufgegebenen Menge Cyclosporin A in einer Reinheit von ca. 97,6% isoliert. Dieses Ergebnis kann jedoch im Hinblick auf eine industrielle Nutzung bezüglich Ausbeute und Reinheit des gewonnenen Wirkstoffes nicht befriedigen. Außerdem sollten diese komplizierten Naturstoffe wegen ihrer thermischer Instabilität und einer möglichen
25 Isomerisierung erfahrungsgemäß keinem Temperaturstreß ausgesetzt werden.

Nach bisherigem Kenntnisstand kommen nur die Anmeldungen von FUJISAWA (WO 9 213094) und BIOGAL (CA 2 096 892) mit einer einstufigen chromatographischen Reinigung aus. Dazu ist allerdings eine aufwendige Fließmittel-
30 kombination bzw. ein Gradient erforderlich, was eine Fließmittelregenerierung erschwert.

Zur genaueren Beurteilung dieser Verfahren fehlen aber meistens Angaben über Ausbeuten und erzielte Produktreinheiten.

Beispiele für einige bisher bekannte chromatographische
Reinigungsmethoden für Cyclosporin A

Patent	Firma	Reinigungsstufen
US 4 117 118	SANDOZ	1. Sephadex LH 20, Methanol 2. Aluminiumoxid neutral, Toluol/Ethylacetat, Gradient 3. Kieselgel 60, Chloroform/Methanol 98:2
US 4 215 199	SANDOZ	1. Kieselgel 60, Chloroform/Methanol 98:2 2. Sephadex LH 20, Methanol 3. Kieselgel 60, Chloroform/Methanol 98:2
BE 879 402	SANDOZ	1. Sephadex LH 20, Methanol 2. Kieselgel 60, Hexan/Aceton 66:33 3. Kristallisation, Aceton, -15°C
WO 9 213 094	FUJISAWA	1. Kieselgel, Hexan Hexan/Ethylacetat, Gradient Aceton
GB 2 227 489	BIOGAL	1. Kieselgel 60, Chloroform/Methanol/Aceton 92:4:4 2. Kieselgel 60, Hexan/Aceton, Gradient
CA 2 096 892	BIOGAL	1. Kieselgel 60, Chloroform/Dichlormethan/ Ethanol 48:50:2 Chloroform/Ethylacetat/Ethanol 48:50:2

Eine kurze Beschreibung der SMB-Technik an sich findet sich z. B. bei R. M. Nicoud, LC-GC INTL Vol. 5, No. 5, 43-47. und K. K. Unger (Hrsg.), Handbuch der HPLC, Teil 2, GIT Verlag, Darmstadt, 1994. (siehe auch Abb. 1)

5

Ausgehend von dem hier geschilderten technischen Stand ergibt sich für eine erfinderische Lösung der chromatographischen Cyclosporin A-Reinigung mit hohen Ansprüchen an Produktreinheit und Ausbeute folgende Aufgabenstellung:

10

- Das neue Verfahren soll mehr als 70% der eingesetzten Cyclosporin A-Menge mit einer der PHARMEUROPA entsprechenden Qualität liefern (bezogen auf die chromatographischen Reinigungsstufen).

15

- Das Verfahren soll höchsten Ansprüchen hinsichtlich Jahresdurchsatz genügen und gleichzeitig den Bedarf an Lösungsmitteln und Materialien für die stationären Phasen drastisch reduzieren

20

- Die technische Lösung soll einfach, schnell und robust sein, d.h. Lösungsmittel und Adsorbentien müssen über einen möglichst großen Zeitraum wiederverwendbar sein. Damit entfällt auch der Einsatz von schwierig einstellbaren bzw. regenerierbaren, isokratisch angewandten Lösungsmittelgemischen und Gradienten.

25

- Chlorierte Kohlenwasserstoffe sollen nicht verwendet werden.
- Das Verfahren soll Möglichkeiten zur Automatisierung, d.h. zur kontinuierlichen Betriebsweise bieten und gleichzeitig den Anforderungen einer GMP-gerechten Produktion genügen.

30

Als Ausgangsprodukt für die chromatographische Reinigung dient beispielsweise ein nach bekannten Methoden (z.B. DD 295 872 A5) aus Cyclosporin A-haltigen Trockenmycel durch Extraktion (Ethylacetat) und Entfettung (Petroleumbenzin / Methanol / Wasser) gewonnener Rohextrakt, der neben einer Reihe zumeist unbekannter gelb und rot gefärbter Substanzen sowie öligere Produkte beispielsweise

35

folgende Zusammensetzung an Cyclosporinen aufweist :

Cyclosporine	Unnorm. Relation % ¹⁾
C	14,9
B	13,7
L	0,2
A	65,1
G	1,2
D	1,2
Sonstiges	3,7

¹⁾ HPLC-analytische Bestimmung nach PHARMEUROPA Vol. 4, No. 4, 270 ff.

5

In einem ersten Chromatographieschritt werden die polaren Cyclosporine (C, B, L, U) von den unpolaren Cyclosporinen (G, D) geschieden, so daß zwei Wertfraktionen entstehen, die neben Cyclosporin A entweder nur polare oder nur unpolare Verunreinigungen enthalten. Dadurch kann in der zweiten Chromatographiestufe Cyclosporin A vorteilhaft von den jeweiligen Verunreinigungen gereinigt werden.

10

Erfindungsgemäß wird die Hochreinigung von Cyclosporin A mittels chromatographischer Reinigung durch Anwendung der konventionellen HPLC in Kombination mit der Simulated Moving Bed - Technik (SMB) wie folgt durchgeführt:

15

1. Chromatographie HPLC oder SMB-Technik

2. Chromatographie SMB-Technik

20

Siehe Schema 1 bis 4.

Genauer gesagt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von Cyclosporin A und verwandten Cyclosporinen aus einem Cyclosporin-haltigen Rohextrakt unter Anwendung chromatographischer Verfahren mit Kieselgel als Adsorbens, welches sich dadurch auszeichnet, daß man Cyclosporin A und verwandte Cyclosporine aus

25

einem Cyclosporin-haltigen Rohextrakt unter Anwendung chromatographischer Verfahren mit Kieselgel als Adsorbens

a) in einer ersten Chromatographiestufe mittels präparativer HPLC oder SMB-Technik den Rohextrakt durch Fraktionsschnitte im aufgetrennten Konzentrationsprofil in eine die unpolaren Begleitstoffe enthaltende Wertfraktion 1 und in eine die mehr polaren Begleitstoffe Wertfraktion 2 separiert und

b) die Wertfraktion 1 (Raffinat) und die Wertfraktion 2 (Extrakt) einer anschließenden zweiten Chromatographiestufe mittels SMB-Technik unterwirft.

Dabei kann man sowohl die erste Chromatographiestufe als auch die zweite

Chromatographiestufe im System Normalphase/Ethylacetat oder Umkehrphase, Acetonitril / Wasser durchführen.

Insbesondere durch den Einsatz der SMB-Technik werden folgende Vorteile erzielt:

- Es läßt sich eine absolut kontinuierliche Arbeitsweise realisieren, d.h., durch den neuen Chromatographiemodus entfallen diskrete Substanzinjektionen. Eine solche kontinuierlich arbeitende Chromatographie ist vor allem für die industrielle Anwendung vorteilhaft.

- Die SMB Technik ermöglicht das Arbeiten mit konzentrierteren Lösungen als bisher. Dadurch sinkt der Lösungsmittelaufwand und damit gleichzeitig auch die benötigte Zeit für die Lösungsmittelrückgewinnung.

- Vergleich SMB- mit HPLC-Technik

Phasensystem	Parameter	Quotient (SMB : HPLC)
Normalphasen-system	Verbrauch Ethylacetat	0,7
	Verbrauch Si 60-Material	0,25
	Produktivität (g Aufgabe/Tag/kg Adsorbens)	2,5
Umkehrphasen-system	Verbrauch Acetonitril/Wasser	0,15
	Verbrauch RP-18-Material	0,15
	Produktivität (g Aufgabe/Tag/kg Adsorbens)	10

5

Wichtigste technische Voraussetzung für die Realisierung einer SMB-Trennung ist die genaue Einstellung der verschiedenen Teilflüsse (siehe Beispiele), um den quasi stationären Zustand der Elutionsfronten in Abhängigkeit von den Schaltzeiten zu gewährleisten.

- 10 Weiterhin ist für die optimale Einstellung der SMB-Trennung eine genaue Kenntnis der Adsorptionsisotherme vom Wertprodukt sowie von den Verunreinigungen im verwendeten Chromatographiesystem notwendig. Diese müssen vorher analytisch bestimmt werden

- 15 Weiterhin gelang es, durch Einführung einer sogenannten fünften Zone die bisher übliche Zwei-Komponenten-Trennung der klassischen Vier-Zonen-SMB zu verlassen. Durch das in dieser zusätzlichen Zone installierte Spülsystem wird jetzt im gleichen Lauf auch die Eliminierung von Verunreinigungen möglich, die bezüglich Cyclosporin A extreme k' -Werte aufweisen. Damit ist eine weitere Qualitätsverbesserung beim
- 20 Wertprodukt möglich.

Üblicherweise können mit der Standard-SMB-Technik Gemische mit k' -Werten zwischen 0,6 und 2,0 meist gut getrennt werden ($k' = 1$ steht für das Wertprodukt). Jedoch werden Komponenten, die außerhalb dieses Bereiches liegen, normalerweise

im Extrakt nur unvollständig ausgespült, so daß es zur Anreicherung im Raffinat gegenüber der Aufgabe (Feed) kommt (Abb. 1).

Nach der neuen erfindungsgemäßen Verfahrensweise werden die Säulen beim Umschalten zwischen der vierten und der ersten Zone durch Spülen mit einem Lösemittel starker Elutionskraft (z. B. Methanol) in einen definierten Zustand gebracht. Die betreffenden Säulen der Apparatur, die sich in dieser fünften Zone befinden, sind dann für die Dauer eines Taktes komplett aus dem geschlossenen Ringverband der übrigen vier Zonen ausgeschaltet (Abb. 1).

10 Diese fünfte Zone wird dabei in zwei Teilschritte unterteilt:

1. Während der Dauer des ersten Teilschrittes werden die Säulen der fünften Zone mit einem geeigneten Lösemittel hoher Elutionskraft gespült, damit die stationäre Phase von noch anhaftenden Verunreinigungen gereinigt wird.

15

Als Spülmittel kommt bevorzugt Methanol zum Einsatz. Im Falle der Spülung des RP- Materials kann auch reines Acetonitril eingesetzt werden, wodurch sich das Problem der Lösemittelrückgewinnung durch den Wegfall eines zusätzlichen Lösemittels vereinfacht.

20

2. Im zweiten Teilschritt wird vom Spülmittel auf das für die jeweilige Trennung erforderliche Elutionsmittel umgespült.

25

Sind die Säulen so auf die Zonen verteilt, daß sich mehrere Säulen in der fünften Zone befinden, so kann der Spülvorgang intensiviert werden, wenn diese Säulen während des Spülens in Parallelschaltung gebracht werden.

30

Eine weitere Verfahrensoptimierung wurde bei der Hochreinigung der sogenannten Wertfraktion 2 der ersten Chromatographiestufe erreicht. Diese Fraktion enthält neben Cyclosporin A vor allem die polareren Verunreinigungen, wie Cyclosporin U und L. Hier konnte überraschenderweise nach Vertauschen der Entnahmestelle für Extrakt und Raffinat an der SMB-Anlage festgestellt werden, daß danach diese Wertfraktion 2 sehr gut getrennt werden kann. Hierbei werden die polaren Verunreinigungen vor dem Wertprodukt Cyclosporin A eluiert, d. h. sie weisen kürzere Retentionszeiten auf. Das bedeutet, daß bei Anwendung dieses speziellen SMB-Regimes in der zweiten

35

Chromatographiestufe, in dieser Stufe dann ausschließlich mit dem RP-18-System gearbeitet werden kann, wodurch sich die Lösungsmittelrückgewinnung stark vereinfacht (Schema 1).

In den folgenden drei Beispielen, die die Eignung der SMB-Technik für die zweite

- 5 Chromatographiestufe belegen, entsprechen die verwendeten Ausgangssubstanzen in ihrem Verunreinigungsprofil typischen Wertfraktionen, wie sie nach der ersten Chromatographiestufe, ausgeführt mit konventioneller präparativer HPLC, vorliegen.

In Beispiel 1 wird die Hochreinigung eines Zwischenproduktes der ersten

- 10 Chromatographiestufe mittels SMB-Technik im Normalphasensystem Si 60 / Ethylacetat demonstriert. Das eingesetzte Produkt enthält neben Cyclosporin A vorwiegend polarere Verunreinigungen.

Im Ergebnis ist die deutliche Abreicherung der polaren Cyclosporine (insbesondere U und L sowie B und C) zu verzeichnen, wodurch die prinzipielle Eignung des

- 15 Trennsystems in Verbindung mit der SMB-Technik verdeutlicht wird.

Das Beispiel 2 beschreibt die Hochreinigung eines Zwischenproduktes, welches als Wertfraktion 1 vorwiegend unpolare Verunreinigungen enthält, mittels SMB-Technik im System Umkehrphase RP-18/Acetonitril, Wasser (60:40, v/v).

- 20 Nach der SMB Trennung ist eine deutliche Abreicherung der unpolaren Cyclosporine (insbesondere G und D) zu beobachten.

Im Beispiel 3 ist die Hochreinigung eines Zwischenproduktes, welches die Wertfraktion 1 mit vorwiegend unpolaren Verunreinigungen enthält, mittels SMB - Technik im

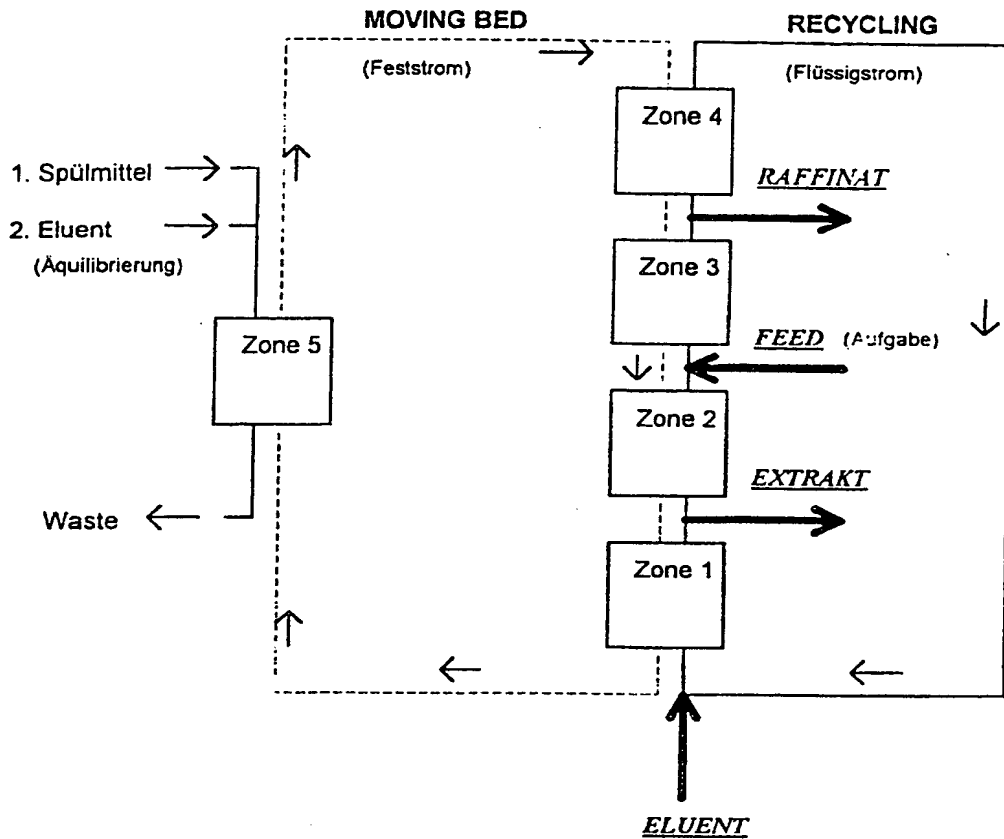
- 25 System Normalphase / Ethylazetat beschrieben.

Im Vergleich zu Beispiel 1 erreicht man durch Vertauschen der Entnahmestellen für Extrakt / Raffinat eine höhere Abreicherung der unpolaren Verunreinigungen sowie eine Lösungsmittelleinsparung.

Diese Feintrennung ist insofern überraschend, da es bis vor Jahren noch, sogar mittels analytischer HPLC, nicht möglich war, diese chromatographisch außerordentlich

- 30 ähnlichen Begleitsubstanzen von Cyclosporin A zu separieren.
Das erhaltene Cyclosporin A entspricht nach Umkristallisation sowohl den Qualitätsanforderungen der USP XXIII als auch der EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2. Edition 1995.

Abb. 1: Prinzipschema einer 5 Zonen SMB



Beschreibung von Abb. 1

Das Fließmittel wird zwischen Zone 1 und 4 im Kreis geführt. Die Probenaufgabe erfolgt zwischen den Zonen 2 und 3. Frischer Eluent wird zwischen den Zonen 4 und 1 aufgegeben. Raffinat (Cyclosporin A) wird zwischen Zone 3 und 4 und Extrakt (Cyclosporin A + Verunreinigungen) zwischen Zone 1 und 2 abgenommen. Jede Säule ist im Verbund mit vier Ventilen für Feed (Substanzaufgabe), Eluent, Extrakt (Wertprodukt + Verunreinigungen), und Raffinat (Wertprodukt) versehen. Die "Bewegung" des Trägermaterials wird durch Verschieben der Sammel- und Aufgabepunkte gegen die Elutionsrichtung simuliert. Dadurch lässt sich eine kontinuierliche

Substanzverteilung zwischen den Phasen im Säulensystem erreichen und die Eluatkonzentrationen an den Abnahmepunkten erscheinen konstant.

Weiterhin konnte im experimentellen Test überraschend gefunden werden, daß die
5 Abtrennung der Nebencyclosporine U und L einerseits sowie G und D andererseits durch die SMB-Technik vollständiger erfolgt als mit konventioneller Chromatographie und zugleich höhere Ausbeuten in den Stufen erreichbar sind. Als Folge daraus werden für vergleichbare Produktivitäten kleinere Anlagen möglich, die somit auch weniger Bedarf sowohl an Säulenfüllmaterial als auch an Elutionsmittel
10 haben.

Natürlich ist prinzipiell eine Anwendung der SMB-Technik auch in der ersten Chromatographiestufe möglich (Schema 3). Dabei kann prinzipiell beim Vorliegen geeigneter Rohextrakte (geringe Beladung mit Ballaststoffen, vor allem lipophiler
15 Natur) auch in der ersten Stufe die SMB-Trennung im System Umkehrphase/Acetonitril, Wasser ausgeführt werden (Schema 4). Da, wie weiterhin gefunden wurde, auch polarere Verunreinigungen im System Umkehrphase/Acetonitril, Wasser nach Vertauschen der Raffinat-/Extrakt-Positionen von Cyclosporin A abgetrennt werden können, ist es dann auch möglich, die Cyclosporin A-Reinigung einzig unter
20 Verwendung des Systems Umkehrphase/Acetonitril, Wasser zweistufig mittels SMB-Technik durchzuführen oder auch unpolarere Verunreinigungen im System Normalphase / Ethylacetat nach Vertauschen der Raffinat-/Extrakt-Positionen von Cyclosporin A abgetrennt werden können, ist es dann auch möglich, die Cyclosporin A-Reinigung einzig unter Verwendung des Systems Normalphase / Ethylacetat
25 zweistufig mittels SMB-Technik durchzuführen.

Schema 1

Cyclosporin A - Rohextrakt



1. Chrom. Stufe	Kieselgel Si 60	
Konv. Präp. HPLC	Ethylacetat	
	Wertfraktion 1	Wertfraktion 2
	Unpolar	Polar
	Cy A+Cy G, Cy D usw.	Cy A+Cy L, Cy U usw.

5



2. Chrom. Stufe	Si 60	Si 60
SMB	Ethylacetat	Ethylacetat

Schema 2

Cyclosporin A - Rohextrakt



5

1. Chrom. Stufe	Kieselgel Si 60	
Konv. Präp. HPLC	Ethylacetat	
	Wertfraktion 1	Wertfraktion 2
	Unpolar	Polar
	Cy A+Cy G, Cy D usw.	Cy A+Cy L, Cy U usw.



2. Chrom. Stufe	RP-18	Si 60
SMB	Acetonitril, Wasser	Ethylacetat
	oder	
	nach Vertauschen der	
	Extrakt-/Raffinat-Position:	
	RP-18/Acetonitril, Wasser	

Schema 3

Cyclosporin A - Rohextrakt



1. Chrom. Stufe SMB	Si 60 Ethylacetat	
	Raffinat	Extrakt
	Cy A+unpolare Verunreinig.	Anreich. d. polaren Verun- reinig. (Beispiel 1)

5



2. Chrom. Stufe SMB	RP-18 Acetonitril, Wasser	
	Raffinat	Extrakt
	Cy A	Anreich. d. unpolaren Verunreinig. (Beispiel 2)

Schema 4

Cyclosporin A - Rohextrakt



1. Chrom. Stufe SMB	RP-18 Acetonitril, Wasser	
	Raffinat	Extrakt
	Cy A+polare Verunreinig.	Anreich. d. unpolaren Verun- reinig. (Beispiel 2)

5



2. Chrom. Stufe SMB	RP-18 Acetonitril, Wasser	
	Raffinat	Extrakt
	Anreich. d. polaren Verunreinig.	Cy A

10

15

Beispiel 1

Abtrennung überwiegend polarer Cyclosporine (Cyclosporine C, B, L, U) vom Cyclosporin A in der zweiten Chromatographie mit Hilfe der SMB-Technik im System Normalphase/Ethylacetat.

5

Anlage	LiChrosep® 8 - 50, Pilotanlage		
Säule	8 Säulen, Länge 100mm x 50mm InnenØ, axiale Kompression		
Stationäre Phase	LiChrospher® Si 60, 15 µm		
Mobile Phase	Ethylacetat		
Rohsubstanz	# 011194	Cyclosporine	Reinheit [%]
		C	2,3
		B	6,9
		L	0,7
		U	1,2
		A	86,2
		G	1,0
		D	0,1
	Summe der Verunreinigungen		13,8%
Substanzaufgabe	Lösung in Ethylacetat 5,8 g/l		
Feed	5,3 ml/min		
Eluent	100 ml/min		
Recycling	151 ml/min		
Detektion	HPLC-Analyse im Extrakt- und Raffinatstrom		
Ergebnisse			
Raffinat		Cyclosporine	Reinheit [%]
		C	0,2
		B	0,4
		L	0,0
		U	0,4
		A	97,4
		G	1,1
		D	0,1
	Summe der Verunreinigungen:		2,8%
	Ausbeute, Cyclosporin A:		> 95 %
Extrakt	Cyclosporin A		75,5 %
	Summe der Verunreinigungen:		24,5 %
Das Ergebnis des Experiments zeigt die prinzipielle Möglichkeit der Abtrennung vor allem der polaren Verunreinigungen vom Cyclosporin A im System Si 60 / Ethylacetat.			

Beispiel 2

Abtrennung überwiegend unpolarer Cyclosporine (Cyclosporine G, D) vom Cyclosporin A mit Hilfe der SMB-Technik im System RP-18/Acetonitril, Wasser.

5

Anlage	LiChrosep® 8 - 50, Pilotanlage		
Säule	8 Säulen, Länge 100mm x 50mm InnenØ, axiale Kompression		
Stationäre Phase	LiChrospher® RP-18, 15 µm		
Mobile Phase	Acetonitril / Wasser - 60 / 40 - v / v		
Rohsubstanz	# 251094	Cyclosporine	Reinheit [%]
		L	0,3
		U	0,8
		A	92,5
		G	4,1
		D	1,6
	Summe der Verunreinigungen:		7,5%
Substanzaufgabe	Lösung in Acetonitril		
Feed	1 g/l 12,7 ml/min		
Eluent	81 ml/min		
Recycling	151 ml/min		
Detektion	HPLC-Analyse im Extrakt- und Raffinatstrom		
Ergebnisse			
Raffinat		Cyclosporine	Reinheit [%]
		Unbekannt ($\alpha = 3,4$)	0,1
		L	0,2
		U	0,5
		A	99,1
		G	0,0
		D	0,0
		Unbekannt ($\alpha = 20,1$)	0,1
	Summe der Verunreinigungen:		0,9%
	Gehalt, Cyclosporin A (getr. Substanz): 99,4 %		
	Stufenausbeute Cyclosporin A:		> 95 %

Die im Experiment erzielte Reinheit des Raffinates beträgt 99,1 %. Nach der Trocknung dieser Substanz, wurde ein Cyclosporin A-Gehalt von 99,4% bestimmt. Das Ergebnis zeigt die Möglichkeit der Abtrennung der unpolaren Verunreinigungen vom Cyclosporin A im System RP-18/Acetonitril, Wasser (60:40,v/v).

Beispiel 3

Abtrennung überwiegend unpolarer Cyclosporine (Cyclosporine C, G, D) vom Cyclosporin A in der zweiten Chromatographie mit Hilfe der SMB-Technik im System Normalphase/Ethylacetat durch Vertauschen der Extrakt- und Raffinat-Entnahmestelle.

5

Anlage	LiChrosep® 12 - 26, Pilotanlage	
Säule	8 Säulen, Länge 100mm x 26mm InnenØ, axiale Kompression	
Stationäre Phase	LiChrospher® Si 60, 15 - 25 µm	
Mobile Phase	Ethylacetat	
Rohsubstanz	Cyclosporine	Reinheit [%]
	C	0,04
	B	0,122
	L	0,075
	A	92,462
	G	2,934
	D	4,177
	Summe der Verunreinigungen	7,538%
Substanzaufgabe	Lösung in Ethylacetat 28 g/l	
Feed	1,5 ml/min	
Eluent	16,4 ml/min	
Detektion	HPLC-Analyse im Extrakt- und Raffinatstrom	
Ergebnisse		
Extrakt	Cyclosporine	Reinheit [%]
	C	0,02
	B	0,075
	L	0,063
	A	99,364
	unbek.	0,219
	G	0,175
	Summe der Verunreinigungen:	0,636%
	Ausbeute, Cyclosporin A:	> 95 %
Das Ergebnis zeigt, daß durch das o.g. Schaltregime durch die SMB-Technik auch unpolare Verunreinigungen sehr gut im System Si 60 / Ethylacetat abgetrennt werden können.		

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Reinigung von Cyclosporin A und verwandten Cyclosporinen aus
5 einem Cyclosporin-haltigen Rohextrakt unter Anwendung chromatographischer
Verfahren mit Kieselgel als Adsorbens dadurch gekennzeichnet, daß man

a) in einer ersten Chromatographiestufe mittels präparativer HPLC oder „simulated
moving bed“-Technik den Rohextrakt durch Fraktionsschnitte im aufgetrennten
10 Konzentrationsprofil in eine die unpolaren Begleitstoffe enthaltende Wertfraktion 1
und in eine die mehr polaren Begleitstoffe Wertfraktion 2 separiert und

b) die Wertfraktion 1 (Raffinat) und die Wertfraktion 2 (Extrakt) in einer
anschließenden zweiten Chromatographiestufe einer weiteren Reinigung
15 mittels SMB-Technik unterwirft.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) sowohl die erste Chromatographiestufe als auch die zweite Chromatographiestufe
im System Normalphase/Ethylacetat oder Umkehrphase, Acetonitril / Wasser
20 durchführt.

b) die Wertfraktion 1 (Raffinat) mittels SMB-Technik im System Umkehrphase,
Acetonitril / Wasser und die Wertfraktion 2 (Extrakt) einer zweiten
Chromatographiestufe im System Normalphase/Ethylacetat unterwirft.

25 c) die Wertfraktion 2 (Extrakt) mittels SMB-Technik im System Umkehrphase,
Acetonitril / Wasser und die Wertfraktion 1 (Raffinat) einer zweiten
Chromatographiestufe im System Normalphase/Ethylacetat unterwirft.

30 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man mittels Einführung
einer fünften Zone einen Spülschritt zuerst mit einem Alkohol und anschließend mit
dem Fließmittel durchführt, und daß bei mehreren Säulen in der fünften Zone diese in
Parallelschaltung durchströmt werden.

4. Verfahren nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß man die Trennung in der zweiten Chromatographiestufe im System Umkehrphase Acetonitril/Wasser mit einem Verhältnis Acetonitril/Wasser von 40 bis 80 zu 20 bis 60, vorzugsweise 60:40 (v/v) durchführt.

5

5. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die Säulen und das Fließmittel in der SMB-Anlage im Temperaturbereich von 40 bis 80 °C vorzugsweise aber bei 60 °C hält.

10

6. Verfahren nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß man im System Umkehrphase/Acetonitril, Wasser den p_H -Wert des Fließmittels im Bereich von 2 bis 5, jedoch vorzugsweise auf 3 einstellt.

15

20

25

30

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales A .Zeichen
PCT/DE 97/00525

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 923 616 A (HIRATA KENTAROU ET AL) 8.Mai 1990 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales A. -Zeichen

PCT/DE 97/00525

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0568698 A	10-11-93	AU 660651 B US 5447854 A AU 1181292 A WO 9213094 A	06-07-95 05-09-95 27-08-92 06-08-92
US 2985589 A	23-05-61	KEINE	
US 4402832 A	06-09-83	AU 565872 B AU 1763383 A BG 42673 A BR 8304330 A CA 1190724 A EP 0101304 A IN 160090 A JP 1667193 C JP 3025201 B JP 59080306 A US 4478721 A	01-10-87 16-02-84 15-01-88 20-03-84 23-07-85 22-02-84 27-06-87 29-05-92 05-04-91 09-05-84 23-10-84
US 4923616 A	08-05-90	JP 1085106 A JP 1003379 A	30-03-89 09-01-89

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales A. Zeichen
PCT/DE 97/00525

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K1/16 C07K7/64 B01D15/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K B01D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 568 698 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 10. November 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 5 ---	1-6
Y	AGRIC. BIOL. CHEM., Bd. 55, Nr. 4, 1991, Seiten 925-32, XP002036378 S. ADACHI ET AL.: "Separation of Peptide Groups with Definite Characteristics from Enzymatic Protein Hydrolysate" siehe das ganze Dokument ---	1-6
A	US 2 985 589 A (D.B. BROUGHTON ET AL.) 1961 ---	
A	US 4 402 832 A (GERHOLD CLARENCE G) 6. September 1983 ---	
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

* "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

* "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

* "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

* "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

* "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. August 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14. 08. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tl. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Deffner, C-A